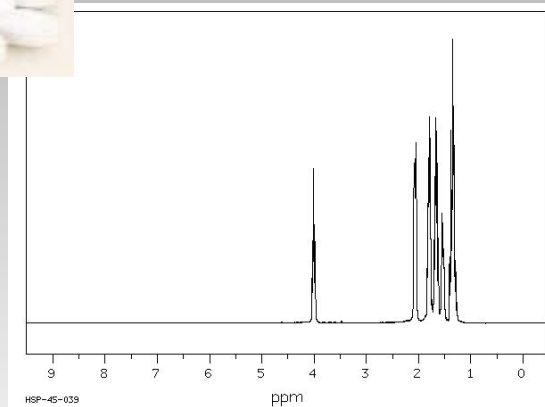
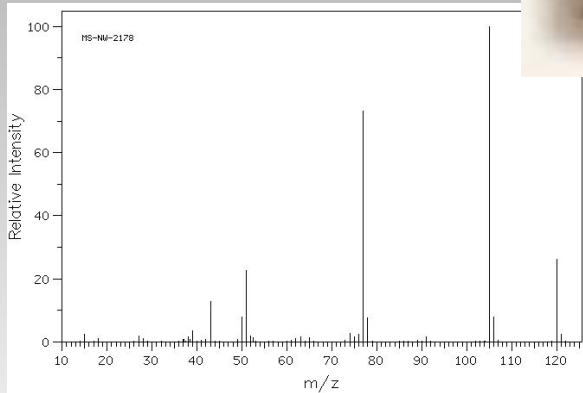
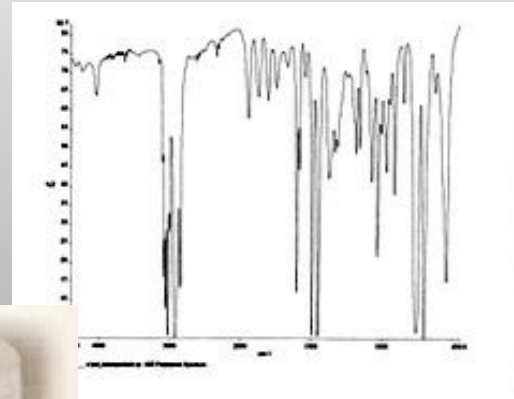
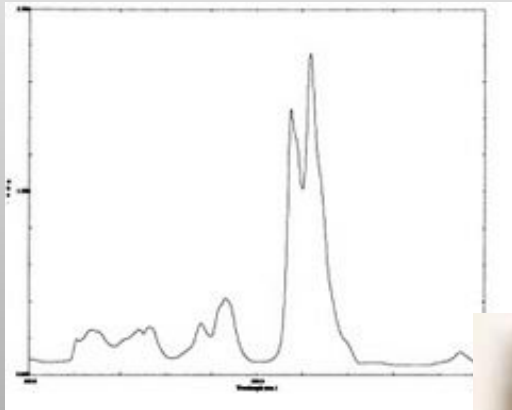


Физико-химические методы исследования биологически активных веществ

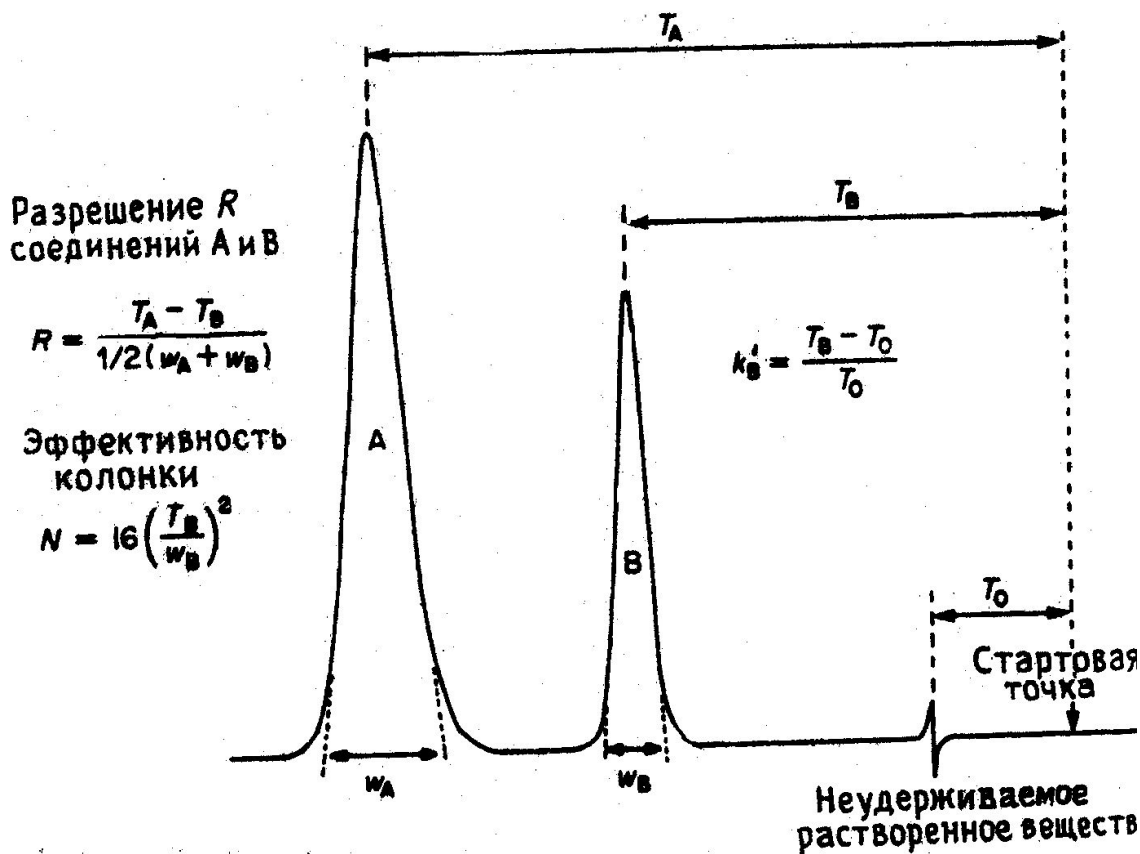


Лекция №16

- Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)
 - Жидкостно-адсорбционная хроматография
 - Жидкостная-жидкостная (распределительная) хроматография (ЖЖХ)
- Тонкослойная хроматография (ТСХ)
 - Общее описание метода
 - Определение величины R_f
 - Основные правила идентификации с помощью ТСХ-анализа
 - Методы визуализации хроматографической картины
- Препаративная колоночная хроматография

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Высокоэффективная жидкостная хроматография - универсальный метод количественного и качественного анализа смесей соединений всех классов веществ (летучих и нелетучих, термически стабильных и нестабильных, полярных и неполярных)



Каждое соединение при данном наборе рабочих условий имеет определенное время удерживания (объем удерживания)

Распространенными видами ВЭЖХ являются:

-

- **Жидкостно-адсорбционная хроматография**

Используется для разделения широкого круга неионных соединений, от умеренно неполярных до умеренно полярных

Углеводороды, амины, спирты и кислоты

Неподвижная фаза - мелкие частицы
твёрдого сорбента (силикагель,
окись алюминия)

Подвижная фаза (элюент) -
органический растворитель

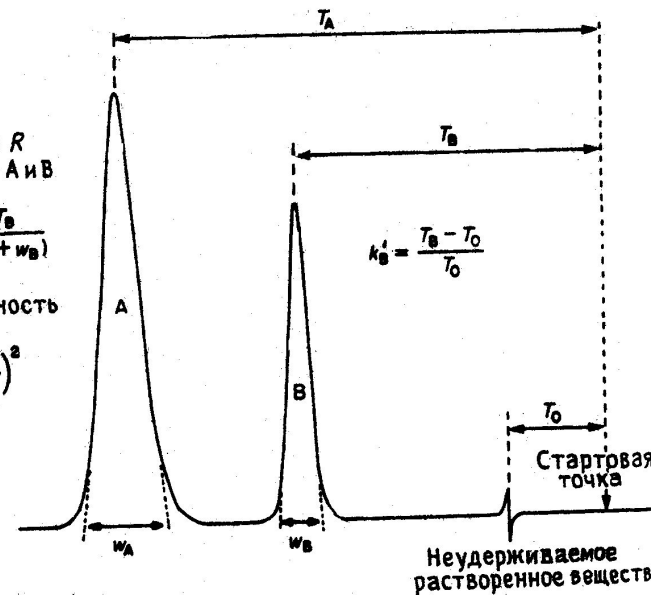
$$k'_A = n_S^A / n_M^A$$

Разрешение R
соединений А и В

$$R = \frac{T_A - T_B}{1/2(w_A + w_B)}$$

Эффективность
колонки

$$N = 16 \left(\frac{T_B}{w_B} \right)^2$$



n_S^A – общее число молекул соединения А, адсорбированных твердым веществом;
 n_M^A – общее число молекул соединения А, растворенных в элюенте.

Активность сорбента

($\text{SiO}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$) и гидратированный оксид алюминия (Al_2O_3)

Общее правило: чем более полярна молекула, тем сильнее она сорбируется

Адсорбционную активность можно регулировать содержанием воды в сорбенте

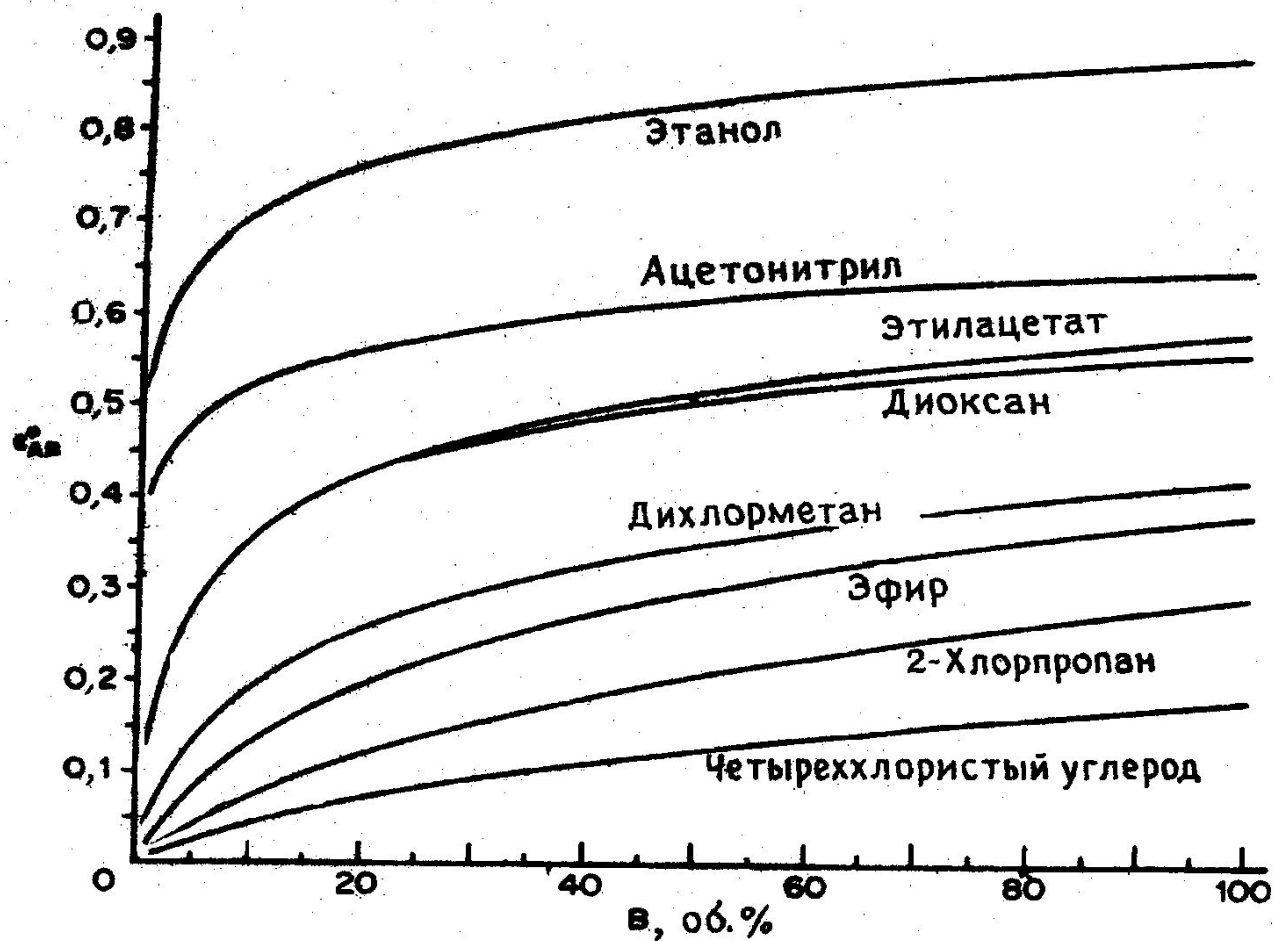
Определение степени активности по Брокману

(значение Rf на силикагеле или оксиде алюминия при использовании элюэнта 20% толуола + 80% петролейного эфира)

Краситель	Степень активности			
	II	III	IV	V
азобензол	0.59	0.74	0.85	0.95
п-метоксиазобензол	0.16	0.49	0.69	0.89
п-аминоазобензол	0.00	0.03	0.08	0.19

Сила растворителя

Количественно сила растворителя определяется величиной диэлектрической проницаемости ϵ^0



Жидкостная-жидкостная (распределительная) хроматография (ЖЖХ)

Метод применим для разделения практически всех типов соединений, особенно полярных соединений, которые не разделяются ЖТХ

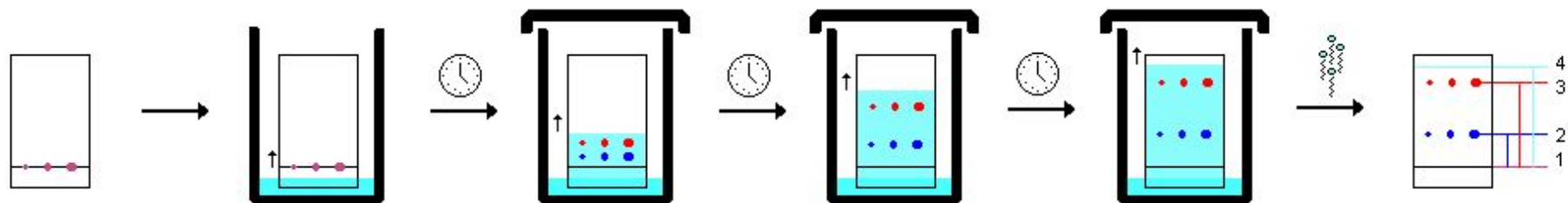
жидкость	Подвижная фаза
	Неподвижная фаза (жидкость химически связана с твердым носителем)

Тонкослойная хроматография (ТСХ)

Хроматография в тонких слоях, или тонкослойная хроматография имеет огромное значение для:

- быстрого качественного анализа смесей,
- контроля хода реакций,
- определения рабочих параметров для препаративной колоночной хроматографии.

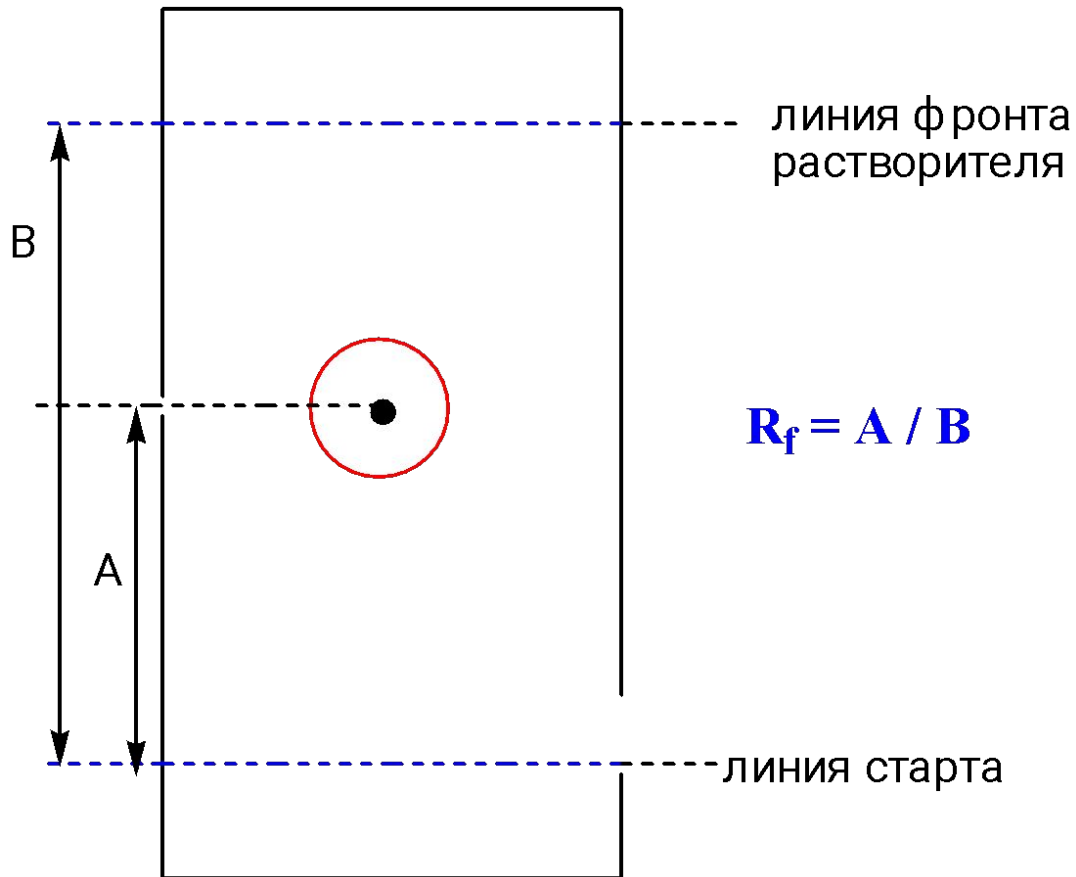
Разделение методом ТСХ – одна из форм жидкостно-адсорбционной хроматографии



Получение начальной зоны (пятна) должно занимать минимальную площадь!

Тонкослойная хроматография (ТСХ)

Величиной, характеризующей данное соединение, является величина R_f



R_f - расстояние от линии старта до середины пятна, отнесенное к расстоянию от линии старта до линии фронта растворителя

Воспроизводимость величин R_f зависит от сорбента, его пористости (емкости), толщины, насыщения камер, температуры, угла наклона пластины, величины фронта растворителя и получения начального пятна

Основные правила идентификации с помощью ТСХ-анализа



1. Проявительная камера изнутри должна быть выложена фильтровальной бумагой

Краевой эффект- искажение хроматографической картины

2. Успех анализа зависит от правильного подбора элюэнта

Когда разделению препятствует сильное перекрытие двух пятен, попытайтесь предпринять следующее:

- а) Изменить химическую природу проявляющего растворителя при сохранении его силы
- б) Изменить природу неподвижной фазы (замена пластинок)

3. Линии старта и фронта растворителя наносятся простым карандашом на пластинку

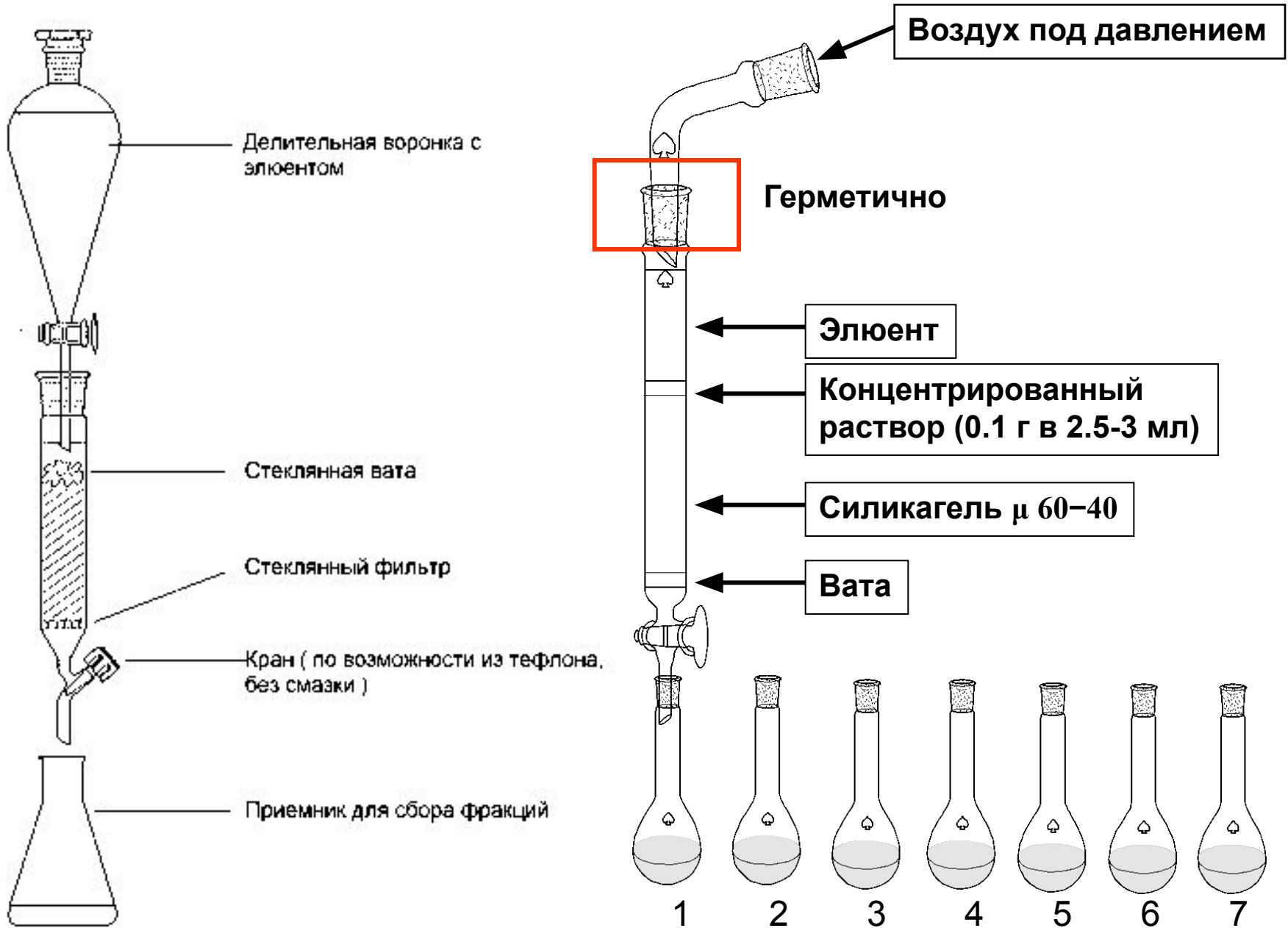
Высота линии старта должна быть выше уровня растворителя в камере!

4. Исследуемое вещество обычно наносится в виде 1-2% раствора в летучем растворителе (CH_2Cl_2 , эфира)

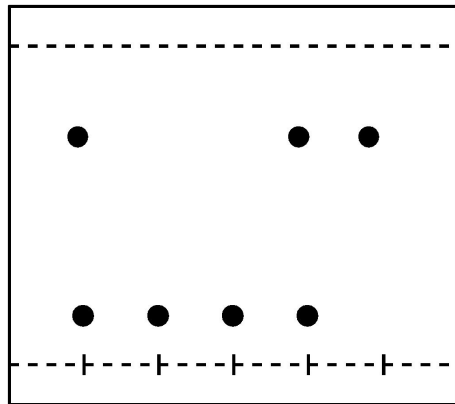
Избегать сильнополярных растворителей!

5. Детектирование пятен хроматограммы проводится подходящим методом

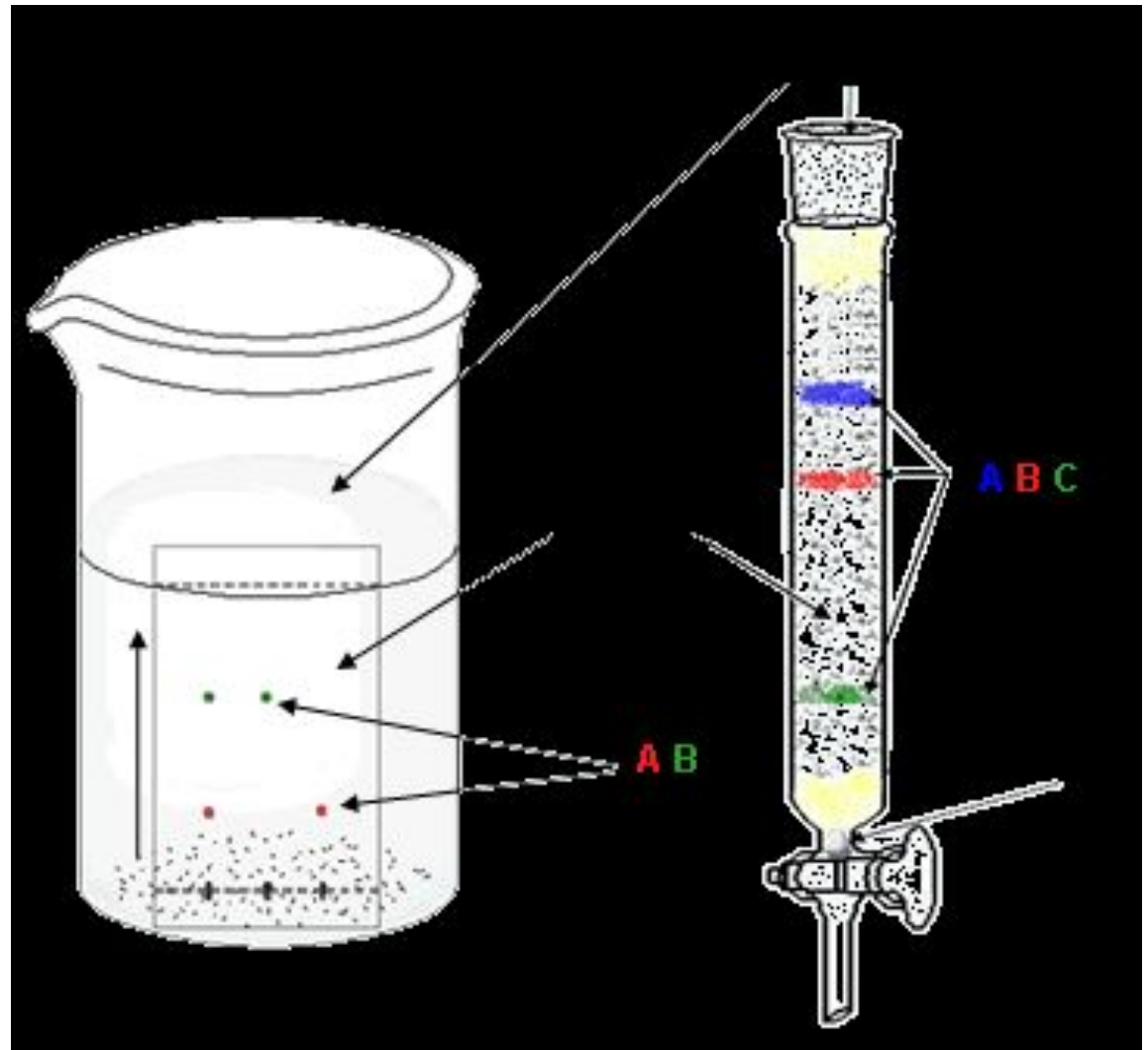
Препаративная колоночная хроматография



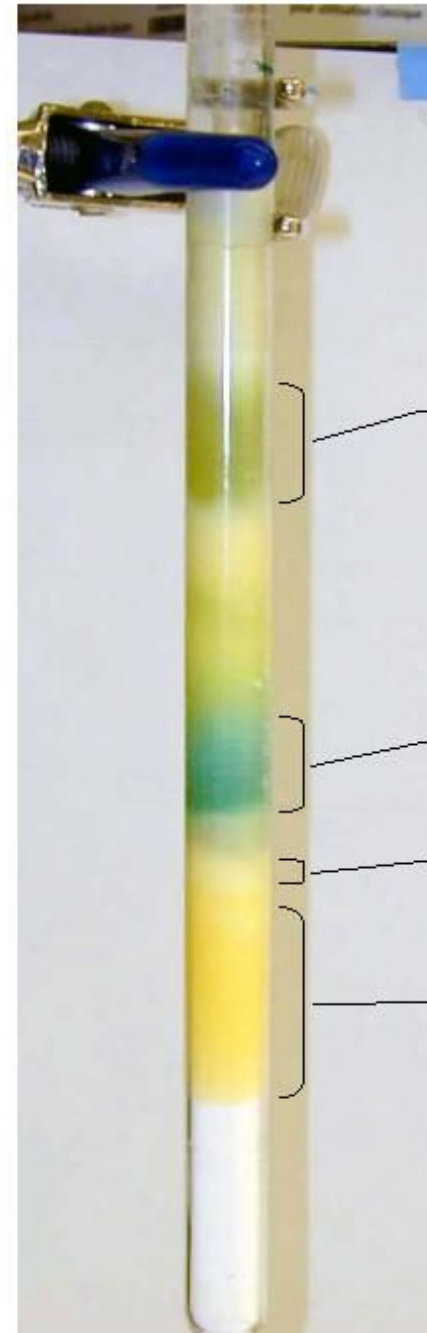
Препаративная колоночная хроматография



Р.м. 1 3 5 7



Препаративная колоночная хроматография



Информационные источники

- Карасек Ф., Клемент Р. введение в хромато-масс-спектрометрию. М.: Мир. -1993. -236с.
- Шарп Дж, госни И., Роули А. Практикум по органической химии. М.: Мир. -1993. -240с.